



TITLE:

E-16 アカゲザルiPS 細胞の樹立

AUTHOR(S):

塩田, 達雄; 中山, 英美; 田谷, かほる; 金子, 新

CITATION:

塩田, 達雄 ...[et al]. E-16 アカゲザルiPS 細胞の樹立. 霊長類研究所年報 2014, 44: 106-107

ISSUE DATE:

2014-12-04

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/214128>

RIGHT:

下,サル)が放射性物質に被ばくした。そこで、福島市のサルを対象として、被ばくによる健康影響を明らかにすることを目的として、今年度は胎仔の成長への影響を検討するための画像診断方法の検討を行った。また、今年度も採取した個体のセシウム測定、臓器及び遺伝子等の標本保存を行った。

【材料・方法】本研究に用いたサルは、鳥獣保護法に基づき実施された個体数調整により福島市内で捕獲され、殺処分された個体である。今年度は111頭を回収し、解剖した。胎仔は2008年から現在までに回収され、ホルマリン固定されていた個体90頭を対象とし、MRIおよびCTによる断層撮影を試みた。

【結果と考察】筋肉中セシウム濃度は、1,000Bq/kg前後を推移したが、越冬期に濃度が上昇する現象は、2013年度にも確認された。MRIおよびCTによる胎仔の断層撮影では、いずれも鮮明な画像が得られ、脳容積や長骨の長さ等が計測可能であると判断された。装置の取り扱いや画像の解析などを考慮すると、実験動物用小型CT装置を用いるのが最も適当と考えられ、次年度に新たな標本を加えながら計測を行う予定である。

(5) 随時募集研究

E-1 類人猿の神経伝達関連遺伝子の多様性解析

村山美穂（京都大・野生動物） 所対応者：今井啓雄

本研究では、ヒトで報告されている性格に関与する遺伝子の相同領域を類人猿で解析し、種間の塩基配列比較や、個体の性格評定との関連解析を行って、飼育や繁殖に活用する情報を得ることを目指している。関連性の解析には多数の試料が必要なため、GAINを通じて飼育類人猿の試料提供を依頼し、比較可能なデータの蓄積を目指している。25年度は、以前にGAINより提供を受けたニシローランドゴリラを含む動物園飼育の14個体、およびガボンの野生8個体の性格評定値と遺伝子型の関連を解析した。ヒトの性格、特に不安や攻撃性との関与が報告されている神経伝達およびホルモン伝達関連の遺伝子(パソプレシン受容体、モノアミンオキシダーゼA、モノアミンオキシダーゼB、セロトニントランスポーター、アンドロゲン受容体)の型判定を行った。22個体の評定結果にもとづき、54項目はDominance、Dependence、Neuroticism、Openness、Vigilanceの5特性に分類された。飼育個体で、モノアミンオキシダーゼの遺伝子型とOpennessおよびDominanceに弱い関連が見られた。今後は個体数、候補遺伝子数を増やし、性格の客観的な評定のためのストレスホルモン測定も行い、性格のマーカーとなる遺伝子を探索する予定である。

E-2 ニホンザルを対象とした高解像度 CNV スクリーニング解析

尾崎紀夫, Aleksic Branko, 久島周（名古屋大・院・精神医学） 所対応者：今井啓雄

近年、自閉症スペクトラム障害、統合失調症を含む精神疾患の発症に強い影響を及ぼす稀なゲノムコピー数変異(copy number variant; CNV)が多数同定されている。本研究では、妥当性の高い精神疾患の霊長類モデルを見つけ出すことを企図して、平成24年度に引き続き、ニホンザルを対象とした全ゲノム CNV 解析を実施した。

ニホンザル379頭を対象にarray CGH (comparative genomic hybridization)で高解像度のCNV解析を行った。その結果、数10kbp程度の小規模CNVから数Mbの大規模CNVを含む多様なCNVを同定した。その中には神経発達に関連する遺伝子に機能的影響を与えるものが含まれていた。例として、NGF欠失、BDNF重複、14番染色体の4Mb以上の重複を同定した。この他、ヒト22q11.23の相同領域で重複を見出した。この領域はヒトで発達障害・統合失調症との関連が示唆されている。

これらCNVを有する個体は精神疾患の霊長類モデルとなる可能性があり、表現型を含めた詳細な検討を行う予定である。

E-3 脂質を標的としたサル免疫システムの解明

杉田昌彦, 森田大輔（京都大・ウイルス研） 所対応者：鈴木樹理

本研究グループは、アカゲザルにおいて、サル免疫不全ウイルス由来のリポペプチドを特異的に認識するT細胞の存在を明らかにしてきた。しかしこの免疫応答の分子機序は不明である。そこでアカゲザル末梢血単核球に反応するモノクローナル抗体を多数作製し、そのなかからリポペプチド特異的T細胞株の抗原認識を阻害する2種の抗体を選択した。得られた阻害抗体の生化学的解析から、それらはアカゲザルMHCクラス1分子様のタンパク質を認識する可能性が高まった。そこでアカゲザル末梢血より種々のMHCクラス1あるいはMHCクラス1関連遺伝子を単離し、トランスフェクションによりこれらの遺伝子群を発現した細胞を準備した。この細胞を用いたフローサイトメトリー解析から、阻害抗体のひとつは、古典的MHCクラス1遺伝子産物や非古典的MHCクラス1遺伝子産物に対して反応性を示すことがわかった。またもうひとつの阻害抗体は、リコンビナントタンパク質を用いたELISAの実験から、MHCクラス1重鎖と非共有的に結合するベータ2ミクログロブリンを特異的に認識することが判明した。以上の結果から、リポペプチド抗原提示分子はMHCクラス1様の分子であると結論付け、その同定に向け遺伝子ライブラリーの構築を完了した。

E-4 The genetic basis of blue eyes in primates

Molly Przeworski, Wynn Meyer (University of Chicago), 早川祥子, Sidi Zhang (Springer Japan)

所内対応者：今井啓雄

How many distinct molecular paths lead to the same phenotype? One approach to this question has been to examine the genetic basis of convergent traits, which likely evolved repeatedly under a shared selective pressure. We investigated the convergent phenotype of blue iris pigmentation, which has arisen independently in four primate lineages: humans, blue-eyed black lemurs, Japanese macaques, and spider monkeys. Characterizing the phenotype across these species, we found that the variation within the blue-eyed subsets of each species occupies strongly overlapping regions of CIE L*a*b* color space. Yet whereas Japanese macaques

and humans display continuous variation, the phenotypes of blue-eyed black lemurs and their sister species (whose irises are brown) occupy more clustered subspaces. Variation in an enhancer of OCA2 is primarily responsible for the phenotypic difference between humans with blue and brown irises. In the orthologous region, we found no variant that distinguishes the two lemur species or associates with quantitative phenotypic variation in Japanese macaques. Given the high similarity between the blue iris phenotypes in these species and that in humans, this finding implies that evolution has used different molecular paths to reach the same end.

E-5 霊長類に変形性斜頭は見られるか？

清水大輔（京都大・院・理学研究科），海部陽介（国立科学博物館・人類研究部） 所内対応者：西村剛

ヒトはその脳サイズから予測されるよりも 10 ヶ月早く、未熟な状態の赤ん坊を産む。これは生理的早産と呼ばれる現象で、ヒトにおける脳進化と直接関連する重要なイベントである。われわれは生後に生じる変形性斜頭(赤ん坊の柔らかい頭骨が外圧で歪む現象、DP と略す)はヒト特有で二次的晩成の進化とともに出現したという仮説をたて研究を進めている。仮説が正しければ、変形のある人類の頭骨化石を探すことにより、生理的早産の進化を直接示すことができる。本課題では、この新しい仮説を検証するために、以下の 2 点の 2 つの予測に関するデータ収集を主目的として課題を遂行した。1) ヒト以外の霊長類に後天的な DP は存在しない。2) ヒト以外の霊長類では出生時の頭骨の成長がヒトよりも進んでいる。これらが妥当であれば、仮説は条件付きで支持される。日本モンキーセンターに所蔵されているチンパンジーとオランウータンの胎児および新生児の全身液浸標本計 6 標本を霊長類研究所所蔵の CT で撮像した。その結果、チンパンジーとオランウータンの新生児では DP は観察されなかった。

E-6 霊長類皮膚発現遺伝子の進化遺伝学的解析

颯田葉子，川嶋彩夏（総研大・先端研） 所内対応者：今井啓雄

ヒトと霊長類の形態的な違いの一つとして、皮膚の構造がある。体毛の有無を含めて、汗腺や、皮下脂肪の量、温度感覚受容体、免疫系、水分調節など、さまざまな形質に関わる分子の分布がヒトと他の霊長類の間では異なることが予想される。そこで、皮膚でのこれらの形質に関わる遺伝子の発現量をヒトと霊長類で比較し、ヒトの形態・生理学的な特性の獲得に関連する遺伝的基盤を明らかにする。これまで、共同研究で提供いただいた、アカゲザル複数個体の皮膚について RNA を抽出してマイクロアレイ解析による発現量の定量比較を行ってきた。この結果をチンパンジーの例と比較したところ、ヒトと他の霊長類(アカゲザルとチンパンジー)の間では、ケラチン及びケラチン関連タンパク質の発現が大きく異なることが明らかになった。提供いただいた各種霊長類(チンパンジー、ゴリラ、オランウータン)の皮膚組織から RNA および DNA を抽出した。現在は、これらのサンプルでのケラチン及びケラチン関連タンパク質の RNA 発現量を定量化するための RT-PCR 用 primer の設計を行っている段階である。また、その他にも、皮膚で発現する水チャネル AQP(アクアポリン)のゲノム配列決定も進めている。

E-9 野生チンパンジーのアルファ雄の肉分配に関する研究

保坂和彦（鎌倉女子大・児童） 所内対応者：Michael A. Huffman

昨年度に引き続き、マハレ山塊 M 集団のチンパンジーの長期資料を整理し、アルファ雄の行動や肉分配に関するデータベース作成を進めた。1991 年以降のべ 8 頭のアルファ雄が在位したが、アルファ雄が肉分配の役割を担うという傾向に変化はない。この役割はアルファ雄自身が主導して奪取するものなのか、それとも、周囲個体の(肉の所有に対する)抑制あるいは委託によるものなのか。この問いに答えるため、①アルファ雄の政治的利益、②分配者―被分配者の互惠性に基づく協力行動、③被分配者による分配者の社会的操作、という 3 つの仮説に照らして検証するための資料整理を行っている。過去 20 年あまり複数の野生チンパンジー調査地で進んだ肉分配の研究は、これらの仮説を対立的に捉え、一つの要因のみを主張しようとするきらいがあった。しかし、Silk et al.(2013)が飼育下のチンパンジー対象の実験で示したように、チンパンジーはこれらすべての動機を追究しており、個体や状況によって重点の置き方が異なるだけであるのかもしれない。このような柔軟な発想に基づく分析を可能にするため、とくに社会行動と肉分配との関係を明らかにする資料整理と分析を今度の課題としていきたい。

E-10 生活習慣と AMY1 遺伝子多型との関連

鈴木良雄，鯉淵絵里，櫻庭景植，広沢正孝，川田裕次郎（順大院・ス健科学），五十嵐庸，長岡功，横山和仁，松川岳久（順大院・医），門屋遥香（順大・スポ健） 所内対応者：今井啓雄

近年、朝食欠食率の増加が問題視されているが、低年齢の児童では、朝から無理なく朝食を摂取する児童もいるが、時間をかけても、なかなか摂取してくれない児童もいる。ところで唾液アミラーゼ活性は出生時には発現しておらず、成長に伴い思春期までに発現するとされている。また唾液アミラーゼ遺伝子(AMY1)にはコピー数多型もある。この AMY1 のコピー数多型が、成長期の唾液アミラーゼ活性に影響し、その結果、朝食摂取における個人差が生じている可能性を検討している。

そこで、2013 年 1 月に長野市内の保育園(4 か所)の園児(4~6 歳児:290 名)を対象に、唾液・DNA の採取を行い、男子 131 名、女子 119 名より唾液を採取した。得られた 250 検体では園児の日齢と唾液アミラーゼ活性との相関係数は男子 $r=-0.003$ 、女子 $r=0.009$ であり、まったく関係は認められなかった。現在、DNA について AMY1 コピー数の解析を行っている。また、2014 年には長野市内の小学生を対象に唾液・DNA の採取を行い、953 検体の唾液・DNA を回収した。現在、この解析も進めている。

E-12 類人猿の生殖関連ホルモン動態―野外におけるサンプル採取保存方法の開発

清水慶子, 石黒龍司 (岡山理科大学・理・動物) 所内対応者: 橋本千絵

霊長類を含む様々な動物を対象として、糞や尿を用いた内分泌動態モニタリングがおこなわれているが、これらの殆どはヒト用の抗体やキットを用いて行われているのが現状である。しかし、近縁関係においても生殖関連ホルモンの分泌機構に違いが認められ、それゆえ、ヒトでの測定系がそのまま類人猿やマカクでの測定に応用可能か否かは不明である。我々はこれまでに独自の生殖関連ホルモン測定法を開発し、それにより類人猿やマカクの血液、尿、糞、唾液中の性ステロイドホルモンや血中、尿中性腺刺激ホルモンの測定が可能となった。しかし、測定系は確立しても、野生の霊長類ではこれらの測定のための糞や尿を採取した後の保存が困難であることが多く、結果を得ることが難しい。これらのことから、本研究では詳細なホルモン測定をおこなうために、保存設備のない場合における野生霊長類のサンプル採取、保存法の開発を行った。対応者が現地で採取した野生霊長類の糞または尿を用い、濾紙、乾燥剤を用いたサンプル保存法を確立した。ついでこれらのサンプルを用いて繁殖状態の推定、性成熟度、老化の程度を推定するための性ステロイドホルモン、性腺刺激ホルモン、副腎由来のステロイドホルモン等を測定し、至適保存条件、抽出条件さらに抗体濃度の決定をおこなった。

E-13 チンパンジーiPS 細胞の樹立と神経・生殖細胞への分化誘導

今村公紀, 矢野真人, 岡野ジェイムス洋尚, 西原浩司 (慶應大・医・生理学) 所内対応者: 今井啓雄

昨年度の共同利用・共同研究を通して樹立した iPS 細胞に対して、基本的な細胞特性の詳細解析を実施した。まず、RT-PCR によって多能性マーカー遺伝子の発現解析を行ったところ、チンパンジー iPS 細胞ではナイーブ状態とプライム状態の双方のマーカー遺伝子が発現しており、また株間で発現パターンに違いが認められることが判明した。さらに、染色体解析の結果から、新生児由来 iPS 細胞のうち NE2 株は正常な核型(48 本)を有している一方、NE1 株は異常な核型(50 本)を示すことが明らかとなった。分化多能性の検証としては、NOD/scid マウス精巣への移植によってテラトーマ形成能を確認したほか、胚様体形成培養によって三胚葉マーカー遺伝子の発現上昇を確認した。

E-14 霊長類の精子形成を支持する分子機序の解明と細胞培養

林煜欽, 中島龍介, 日下部央里絵 (慶應大・医・生理学) 所内対応者: 今井啓雄

昨年度の共同利用・共同研究を通して考案した霊長類精子形成細胞の新規培養法「Testicular sphere 形成法」を利用して、マモセット成体精巣由来の培養細胞の分子特性解析を行った。まず、Testicular sphere における遺伝子発現を培養開始から 1 週間ごとに最長 4 週間解析したところ、培養の経過とともに精子形成の後期に相当するマーカー遺伝子の発現が順次消失し、最終的には精原細胞や初期の精母細胞のマーカー遺伝子のみが観察された。同様の結果は免疫染色においても観察され、培養 2 週目の Testicular sphere では精原細胞マーカー陽性細胞と減数分裂期マーカー陽性細胞が共に確認されたが、培養 4 週目になると後者は認められなかった。これらの結果はフローサイトメトリーによる DNA 含量解析とも一致しており、本手法は霊長類の精原細胞の培養に指向した培養法であることが推測された。そこで、培養下の Testicular sphere において精子形成を誘導する試みとして、GDNF の除去やレチノイン酸・テストステロンなどの添加を行った変法条件での培養も試みてみたが、いずれの場合においても減数分裂期のマーカー遺伝子の発現は確認できなかった。

E-15 ニホンザルにおける心筋線維化の病理学的解析

平田暁大 (岐阜大・生命科学総合研究支援センター・動物実験), 加藤由隆, 酒井洋樹, 柳井徳磨 (岐阜大・応用生物・獣医・獣医病理) 所対応者名: 鈴木樹理

我々は、ニホンザルにおいて心筋線維化(Cardiac Fibrosis:CF)が高率に見られることを見出し、その特徴について病理組織学的に検討した。京都大学霊長類研究所において斃死または安楽殺されたニホンザル 54 例(10%ホルマリン固定標本)を使用し、定法に従いパラフィン包埋切片を作製し、HE 染色、マッソントリクローム(MT)染色、ピクロシリウスレッド(SR)染色を実施した。心臓の間質、心外膜下、血管周囲において線維性結合組織の増生が認められ、CF の発生率は幼獣(3 歳未満, n=15)で 6.7%、亜成獣(3 歳以上~7 歳未満, n=13)で 13.0%、成獣(7 歳以上~20 歳未満, n=17)で 94.1%、老獣(20 歳以上, n=9)で 100%であり、加齢とともに有意に増加していた。また、SR 染色標本を画像解析ソフトにより解析し、心臓組織の単位面積あたりの線維化の割合を定量化したところ、線維化の程度も加齢と共に有意に増加していた。心臓における炎症細胞浸潤の有無によって CF の発生率に有意な差が認められ、持続する軽度な炎症細胞浸潤が CF の発生に関与している可能性が示唆された。以上より、ニホンザルでは心臓の CF が高率に認められ、加齢とともに、発生率は上昇し、程度も悪化することが明らかとなった。

E-16 アカゲザル iPS 細胞の樹立

塩田達雄, 中山英美, 田谷かほる (大阪大・微研), 金子新 (京都大・iPS 研) 所内対応者: 明里宏文

後天性免疫不全症候群(AIDS)の原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス 1 型(HIV-1)は宿主域が狭く、ヒト以外に感染する動物はチンパンジーのみである。

我々は、アカゲザルの人工多能性細胞(iPS 細胞)に遺伝子操作を加え、HIV-1 が個体内で感染・増殖できる動物実験モデルアカゲザルを作出することを最終目標に、まずはアカゲザルの iPS 細胞樹立を行い、CD4 陽性 T 細胞への分化誘導方法を確率することを目的とした。

アカゲザル末梢血から T 細胞を分離し、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc のいわゆる山中 4 因子を発現する 4 種類のセンダイウイルスベクターを用いて iPS 細胞の樹立を試みた。しかし、得られた細胞を RT-PCR において遺伝子解析した結果、センダイウイルスベクターの感染は確認できるものの、形態およびアルカリフォスファターゼ活性により未分化性 iPS 細胞樹立とは同定できなかった。そこで山中 4 因子が 1 つのセンダイウイルスベクターにすべて発現しているものを用い、

現在アカゲサル末梢血 T 細胞由来 iPS 細胞の樹立を行い、同定解析中である。

E-17 チンパンジーiPS 細胞分化に与える環境化学物質の影響

高田達之，白井恵美，島田愛美，小野友梨子，谷口聡美，山田羽純（立命館大・薬学），檜垣彰吾（立命館大・グローバルイノベーション研究機構） 所内対応者：今井啓雄

チンパンジーiPS 細胞分化に与える環境化学物質の影響を評価するにあたり、まず、その対照としてカニクイザル ES 細胞および iPS 細胞を用いた実験を行った。カニクイザル ES 細胞と iPS 細胞から胚様体(EB)を形成し、分化に伴う遺伝子発現の変化を調べた。その結果、数種類の ES 細胞・iPS 細胞において、分化に伴う TEKT1(精細胞特異的遺伝子)発現量の上昇が認められたことから、TEKT1 発現量の上昇は、ES 細胞・iPS 細胞分化において極めて共通な現象であると考えられた。

そこで次に、TEKT1 の機能を詳細に解析するため、TEKT1 プロモーター制御下で Venus を発現するカニクイザル ES 細胞を作成し、EB 形成実験を行った。その結果、分化に伴う Venus 発現細胞の出現、および特徴的な管状構造と活発な運動性を有する繊毛の形成が確認された。この Venus 発現細胞をセルソーターにより分取し、遺伝子発現解析を行った結果、生殖細胞特異的遺伝子は発現していないものの、精巣で発現の高い TEKT3、FOXJ1 などの発現が認められたことから、本培養法により、ES 細胞と iPS 細胞は精巣と関連する組織へと分化している可能性が示唆された。

E-18 インターフェロンλ遺伝子ファミリーの進化的解析

溝上雅史，杉山真也（国立国際医療研究センター），中川草，今西規（東海大），石田貴文（東京大），五條堀孝（国立遺伝学研究所） 所内対応者：今井啓雄

本年度では、提供されたチンパンジーゲノム(P.t.t と P.t.v のハイブリッド)を用いて、目的の領域である Interferon lambda(IFN-λ)遺伝子ファミリーがコードされている領域に対して、ロング PCR による増幅とシーケンス解析を試みた。この領域は、類似性の高い 3 遺伝子と 1 つの偽遺伝子が存在することがヒトで明らかとなっている。この領域を遺伝子ごとに分けて取得するための 6 つのプライマーセットを設計し、P.t.v とヒトで効率よく増幅することを確認したが、本検体ではゲノムの断片長が短いためかロング PCR は困難であった。そこで、短い PCR 領域に変更したプライマーセットを新たに準備し、ヒトと P.t.v で検証を行った。来年度では、本検体での増幅ができれば、サンプル調製と次世代シーケンサー解析を行う。既に、ヒト、チンパンジー(P.t.v)、ボノボ、ゴリラ、テナガザルについて、それぞれ複数検体のシーケンスデータを得ているので、それらの配列について比較解析を行った。本検体のシーケンスデータが得られた段階で、これらの比較データに加えて種と亜種間での IFN-λ の進化の過程を解析する。

E-19 頭骨の形態から探るイルカの系統と音響機能の発達：霊長類との比較

丸山啓志，松岡廣繁（京大・理・地鉦），安井謙介（豊橋市自然史博），西村剛（京大・霊長研）

所内対応者：友永雅己

イルカ類は、鳴音コミュニケーションに基づき社会構造を形成する点で、霊長類と共通している。その一方で、イルカ類の鳴音についての送信・受信システムは、霊長類と異なっているため、比較することで、各分類群のコミュニケーションの発達について示唆を与えることができる。本研究では、イルカ類固有の器官である「気洞」の鳴音の受信システムにおける役割を明らかにすることを目的とした。ここでは、化石種のイルカ類も含めて比較可能にするため、「気洞」の形状・容積を求めるために、頭骨の X 線 CT スキャンによる撮像を行った。用いた種は、ホイッスルという鳴音を発するマイルカ科(ハンドウイルカ・カマイルカ)、ホイッスルを発さないネズミイルカ科(ネズミイルカ他 3 種)・ラブラタカワイルカ科(ラブラタカワイルカ)であった。その結果、従来のネズミイルカ科の「気洞」についての左右非対称性を裏打ちする結果となった。加えて、イルカ類に見られる頭骨の左右非対称性について、新たな知見を得ることができ、霊長類や鳥類(フクロウ)と対比可能なものであった。今後は、撮像する標本を増やすだけでなく、マイルカ科であるのにホイッスルを発さないセッパリイルカ属(イロワケイルカ)や、イルカ類の外群であるアカボウクジラ科の標本も扱い、包括的に取り組んでいく。

E-20 MC1R 遺伝子に着目したボノボの集団遺伝学的研究

本川智紀(ポーラ化成工業) 所内対応者：川本芳

MC1R(melanocortin-1 receptor)は色素細胞表面に存在する色素産生に関与するレセプターである。ヒトにおいて MC1R 遺伝子は、多様性が高く人種特異的多型が存在するため、MC1R 多型情報は、ヒトの分岐過程を考察する際に有益な情報のひとつとなっている。私はヒト以外の霊長類においても、当遺伝子のデータは分岐過程を考察する上で有益な情報となると考えている。本研究ではボノボの遺伝子を解析し、すでに保有するヒト、チンパンジーなどの遺伝子データと併せ、当遺伝子の進化過程を比較解析することを最終目的としている。

本年度は、ワンバとイヨンジ合計 20 例の糞抽出 DNA からダイレクトシーケンス法を用いた検討を行った。その結果、対象領域(MC1R コーディング、プロモーター領域合計約 2000 塩基)がすべて解読できた数は 6 例、2/3 以上の範囲で解読できた数は 3 例、1/3 以上の範囲で解読ができた数は 4 例、それ以下は 7 例であった。

以上の結果より、ワンバとイヨンジのコンセンサス配列および SNP が同定できる見込みであり、このデータをもとに、ダイレクトシーケンス法での解読が困難な領域をカバーできる新たな手法(リアルタイム PCR 法による SNP 解析)の構築が可能になったと考える。

E-21 霊長類生殖細胞における小分子 RNA の解析

塩見春彦, 平野孝昌, 山中総一郎, 岩崎由香, 齋藤都暁 (慶應大・医・分子生物), 關菜央美 (東大・理・生物化学)
所内対応者: 今井啓雄

PIWI は昆虫からヒトまで広く保存されている、生殖幹細胞維持等に必須の遺伝子である。PIWI タンパク質は PIWI-interacting RNA (piRNA) と呼ばれる小分子 RNA と結合し、piRNA の配列特異的に標的を認識することで遺伝子発現を負に制御する。霊長類では、マウスが有する 3 種類の PIWI に加え、4 種類目の PIWI (PIWIL3) が存在する為、霊長類はマウスとは異なる PIWI-piRNA 機構を有すると考えられるが、その詳細は明らかになっていなかった。我々は、PIWIL1 を特異的に認識する抗体を作製し、コモン・マーモセット及びアカゲザルにおいて PIWIL1 についての解析を行った。その結果、コモン・マーモセット、アカゲザルの両種の精巣において精母細胞及び精細胞で PIWIL1 が発現することを見出した。また、両種の PIWIL1 に結合する piRNA の単離にも成功した。さらに、コモン・マーモセット PIWIL1 結合 piRNA の解析を進めたところ、遺伝子間領域及びトランスポゾン由来の piRNA に加え、偽遺伝子領域や tRNA 由来であるマウスではほとんど見られない種類の piRNA が存在することを見出した。

E-22 ニホンザル初期視覚系の色覚情報処理回路の研究

佐藤宏道, 内藤智彦, 澤井元, 三好智満, 七五三木聡 (大阪大・医学系研究科), 末松尚史 (大阪大・生命機能研究科)
所内対応者: 高田昌彦

本共同研究においては霊長類研究所所蔵の研究試料「ニホンザル頭蓋骨(下顎なし)」(名称: PRI#5850) を譲り受け、研究に供している。技術的目的はニホンザル全動物標本における網膜神経活動記録実験のための脳定位固定装置の改良及び、網膜神経節細胞の活動を微小電極により記録するための電極刺入位置及び角度の調整をこの標本を用いて行うことにある。この研究はサル初期視覚系における色覚情報処理回路を定量的に解析することがそもそもの目的であり、現時点 (2014 年 3 月末) では実験は準備段階にあり、ネコの 1) 網膜神経節細胞-外側膝状体ニューロン間、2) 外側膝状体ニューロン-一次視覚野ニューロン間の同時記録を行った。これにより、受容野の時空間構造を形成する結合ルールが明らかになり、サルの視覚実験を行うための刺激-記録解析システムが構築された。以下の写真は、譲渡されたサル頭蓋骨を脳定位固定装置に固定し、改良したアタッチメントによる眼球固定および網膜神経節細胞記録のシミュレーションの様子。

E-23 サル類における聴覚事象関連電位の記録

伊藤浩介 (新潟大・脳研) 所内対応者: 中村克樹

言語や他の高次脳機能と異なり、明らかな適応的意義の見当たらない音楽は、何故どのように進化したのだろうか。本研究は、従来の行動指標の代わりに事象関連電位 (ERP) を用いて、音楽の系統発生を探る試みである。すなわち、和音やメロディーなどの様々な音楽刺激に対する ERP を種間比較することにより、これらの音楽刺激の脳処理の進化を明らかにすることを目的とする。複数年実験計画の初年度にあたる本年度は、マカクザルを対象に、無麻酔で頭皮上から聴覚事象関連電位を記録するための方法論を確立することを目指した。ヒトを対象とする場合と同じように無侵襲で脳波記録を行うため、動物はチェアを用いて必要最低限の保定をしたことと頭部を剃毛した以外は、ヒト脳波記録用のコロジオン電極をヒトと全く同じ方法で、頭皮上 9 箇所 (F3, F4, C3, C4, P3, P4, Fz, Cz, Pz)、左右の耳朵、左眼窩左下に設置した。その上で、スピーカーから提示した和音や純音刺激に対して、聴覚事象関連電位が安定して記録できることを確認した。本課題は 10 月に採択され半年の研究期間であったが、次年度以降の研究に向けて十分な準備を整えることができた。

E-24 霊長類の性的二型とその多様性を制御する分子機構の解明に向けた基礎技術開発

太田博樹, 勝村啓史, 松前ひろみ (北里大・医学部・解剖学) 所内対応者: 今井啓雄

【目的】本研究では、末梢血及び糞便あるいは唾液などを材料とした mRNA で、血液中の性ホルモンの変動と同調する遺伝子発現変動をトレースしうるか、技術開発を行うことを目的としている。

【方法】霊長類研究所において、ホルモン分析を行うために採血されたマカクについて、そのホルモン分析で用いられた残り (血球成分) を分与してもらい、血漿中の性ホルモンの情報と白血球中の遺伝子発現の情報を照合し、血中の性ホルモンの変動と同調的に発現変動が起こっている遺伝子をサーチする。

【進捗】(1) 人類進化モデル研究センター長・岡本宗裕教授のもと、ニホンザル (メス) の性周期を研究している印藤頼子研究員から定期的に採血した血液の分与を受けた。印藤研究員は 1 週間に 4 頭のニホンザルから 3 回 (月、水、金) 採血を行った。約 1ml 採血し、血漿はホルモン動態の分析に用いられた。残った血球成分 (約 0.5ml) を RNeasy に入れ、今井啓雄准教授がこれらを保管した。こうした採血を複数回おこないチューブの数は 100 本を超えた。(2) 北里大学医学部の本研究室では、本研究の研究協力者・勝村啓史 (博士研究員) の指導のもと、関口陽介 (学部学生) が、① 3 時間毎に採取したヒトの唾液から RNA を抽出し、② 定量 PCR を行い時計遺伝子の 1 つである PER2 遺伝子の発現変動がトレースできるか実験をおこないこれに成功した。

E-25 霊長類の老化小脳で変化する遺伝子発現の解明

石川欽也 (東京医科歯科大・医学部附属病院・神経内科学) 所内対応者: 大石高生

小脳の老化でどのような遺伝子発現の変化が起き、それがどのような小脳機能の変化に関連しているかは全く不明である。我々はヒトにおける小脳の老化の遺伝子変化を検索してきたが、ヒトでは様々な個体差や環境差による影響によって、2 次的に遺伝子発現が影響される欠点がある。このため、ヒトより均一な環境に近い条件で生育した霊長類での検索を行い、ヒトでの解析結果と比較することで、真の老化関連遺伝子を発見することを目的として、本研究を行った。

平成 24 年度までで合計老齢ニホンザル 2 頭 (28 歳、26 歳、いずれも雌) とアカゲザル 1 頭 (5 歳、雄) について、小脳をヒ

トと同じ3か所ずつ採取した。今年度はさらに4検体を追加集積できた。本年度併行してヒトの健常者および疾患患者小脳組織での遺伝子発現を解析した。その結果、老化での遺伝子発現の量的変化は軽微であるのに対し、疾患によって健常者の2倍以上もしくは半分以下に変動する遺伝子を30程度発見した。この結果を受けて、霊長類小脳において、老化ではヒトと同様にこれらの遺伝子の発現には大きな変化がないことを確認することにし、平成25年度末にその解析を進めた。

E-26 マカク類の比較ゲノミクス

藤山秋佐夫, 豊田敦, 野口英樹, 辰本将司, 福多賢太郎 (国立遺伝研) 所内対応者: 今井啓雄

我々の研究グループでは、ニホンザルをはじめ、アジア地域に生息するマカク類を対象に比較ゲノム解析を行っている。本課題では、霊長類研究所が保有する中国産アカゲザル及びタイワンザルについて下記の試料の提供を受けた。このうち、アカゲザル(メス、血液)とタイワンザル試料から高分子DNAの抽出を行い、イルミナ HiSeq2000/2500 による大規模シーケンシングにより、各々ゲノム被覆度46倍及び56倍のペアエンド配列を得た。

タイワンザル	⑩ 201015 メス	心房、凍結保存
中国アカゲ	1747⑥ 101014 オス	心室、凍結保存
中国アカゲ	1765⑦ 101005 オス	心室、凍結保存
中国アカゲ	Mm1846 メス 08 年生	血液(ヘパリン血)

得られた配列は、ニホンザル(4地域)、カニクイザル、アカゲザル(インド)参照配列と比較ゲノム解析を行い、ニホンザルとアカゲザル(中国)が最近縁でありタイワンザルはやや離れた系統になることがわかった。本共同利用による成果の詳細については、26年度の霊長類学会で発表予定(福多)である。

E-27 霊長類のゲノム・トランスクリプトーム・エピゲノム研究

郷康広 (自然科学研究機構・新分野創成センター), 渡我部昭哉 (基礎生物学研究所・脳生物学研究部門), 重信秀治 (基礎生物学研究所・生物機能解析センター) 所内対応者: 大石高生

平成25年度は100個体のマカクザルの血液から調整したDNAを用いて、遺伝子コーディング領域(全エキソン)の配列決定を行った。ヒトの精神・神経疾患関連遺伝子として同定されている遺伝子とマカクザルにおける相同遺伝子の変異解析を行った結果、5,280遺伝子において100個体中の少なくとも1個体以上に遺伝子機能喪失変異を認めた。ヒトにおける先行研究により12の精神・神経疾患に何らかの関連があると報告されている4,082遺伝子における遺伝子機能喪失型変異を探索した結果、701個の遺伝子に変異が生じていることを明らかにした。このうち神経・神経疾患に関与する代表的な遺伝子を図に示す。見いだした遺伝子には、神経細胞間の情報伝達の中心的役割を果たすドーパミンに関係する遺伝子やパーキンソン病の有力な遺伝子、セロトニン受容体、ヒストン脱アセチル化酵素関連遺伝子などがあり、それらの遺伝子に機能喪失変異を有する個体や家系を見いだすことに成功した。

E-28 アカゲザル骨髓細胞からのiPS細胞樹立およびT細胞への分化

金子新, 田谷かほる (京都大・iPS研), 塩田達雄, 中山英美 (大阪大・微研) 所内対応者: 明里宏文

抗原特異的なヒトCD8T細胞から作成したiPS細胞をソースに、*in vitro*で分化誘導したCD8T細胞は抗原特異的な免疫能を発揮することが知られる。本研究では、骨髓性CD34陽性細胞からiPS細胞を樹立し、困難とされるT細胞への分化誘導方法を確立するとともに、iPS細胞由来T細胞の自家移植によりヒト免疫不全症候群などによる破綻した免疫機構の再構築を免疫学的にヒトに近縁な霊長類を用いて検討することを最終目的としている。本年度は先ずアカゲザルのCD34陽性細胞由来のiPS細胞樹立を目指したが、アカゲザルのiPS細胞はヒトやカニクイザルに比して樹立・維持が困難であること、骨髓穿刺にはある程度の侵襲を伴うことなどから、先ずは採取の比較的容易なアカゲザル末梢血細胞をソースとしてiPS細胞樹立・維持条件の最適化を試みた。

アカゲザル末梢血から末梢血単核球を分離し、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycのいわゆる山中4因子を発現するセンダイウイルスベクターを用いてiPS細胞の樹立を複数回試みた。いくつかの培養条件を最適化し、embryonic stem cell様の形態を示すコロニーを樹立・維持ができるようになった。今後は骨髓CD34陽性細胞をソースにしたiPS細胞の樹立に取り組む。

E-29 Metabolome and lipidome signatures of the human brain

Philipp Khaitovich (CAS-MPG Partner Institute for Computational Biology), Masahiro Sugimoto (Institute for Advanced Biosciences, Keio University), Yasuhiro Go (Center for Novel Science Initiatives, National Institute of Natural Sciences) 所内対応者: 大石高生

In this project, we plan to obtain a lipidome and metabolome features of human brain as compared to the brain of closely related primate species. We plan to measure the metabolite and lipid concentration levels in eight different brain regions of humans and five non-human primate species (chimpanzee, gorilla, orangutan, gibbon, macaque). The comparison among these species will allow us to identify the human-specific metabolic features of the brain and detect functional changes that evolved on the human lineage. Further, the identified metabolome and lipidome composition differences among species and brain regions will provide us insights into general metabolic characteristics of human brain that underlie the unique human cognition, as well as make it susceptible to neurological disorders common in humans.

In 2013, we obtained one orangutan brain sample and dissected it into eight regions. We will perform lipidome and metabolome analysis of these samples at Institute for Advanced Biosciences, Keio University. We also aim to obtain more non-human primate brain samples in the next year.

E-30 コモンマーマセットを用いた加齢性記憶障害の研究

齊藤実, 宮下知之 (東京都医学研) 所内対応者: 中村克樹

将来コモンマーマセットを用いて加齢性記憶障害の行動薬理学・行動遺伝学的研究を行うことを計画している。こうした研究に必要な、コモンマーマセットの基礎的な行動実験の方法論取得を目的として、中村教授との共同研究を行った。年度末から始まり滞在期間が一ヶ月程と短かったが、中村教授が開発した学習装置を用いたマーマセットの訓練の仕方の習得を目指した。

まずは、マーマセットの体調管理を学んだあと、目的である基本的な学習記憶課題である視覚弁別課題の訓練の仕方を若齢体で習った。付随して学習装置のセットアップ、報酬として用いるエサの作製法、脳脊髄液の採取方、脳波の測定方法について学んだ。

老齢体は一般的に運動能力やモチベーションが低いいため、利用出来るタスクに工夫が必要なが予測される。今回学んだ学習記憶課題を進展させることで老齢体での記憶評価に適した課題の開発を進める予定である。

E-31 拡散スペクトラム MRI を用いたチンパンジーの神経回路構造の解明

岡野栄之 (慶應義塾大・医学部・生理学教室), 岡野ジェイムス洋尚 (東京慈恵会医科大・医学部・基礎・臨床講座・再生医学研究部), 疋島啓吾, 酒井朋子 (慶應義塾大・医学部・生理学教室・公益財団法人実験動物中央研究所)

所内対応者: 濱田穰

平成 25 年度の年度末に採用され、研究期間も非常に限られていたため、実際に霊長類の脳標本の撮像を行うまでに至らなかった。しかしながら、本随時研究の研究計画は、平成 26 年度の共同利用研究としても採択され、継続して実施する予定である。現在、我々は平成 26 年 10 月末までに和光の理化学研究所内に 9 テスラ以上で 30cm 以上のボアサイズを有する高磁場小動物用 MRI 装置を導入することを目標に、新規の超高磁場システムや高感度コイルの開発に取り組んでいる。この高磁場 MRI 装置が導入された暁には、チンパンジーなどの大型類人猿を含めた全ての霊長類の脳標本の神経線維構造や髄鞘分布を高精細に(30 マイクロメートルの空間分解能で)3 次元上に再構築することが可能となる。そこで本年度において、我々は本随時研究の継続研究として、貴研究所での脳標本の整理・運送を行うとともに、新規 MRI 装置を用いて、各霊長類の脳標本のサイズに対応した高磁場 MRI 撮像シーケンスを確立する予定である。

3. 平成 25 年度で終了した計画研究

該当なし

4. 共同利用研究会

第 42 回ホミニゼーション研究会「ワイルドライフ・サイエンス」

日時: 2013 年 3 月 8 日(土)・9 日(日)

場所: 国際高等研究所(参加人数: 約 50 人)

世話人: 松沢哲郎、平井啓久、古市剛史、湯本貴和、マイク・ハフマン、岡本宗裕

ホミニゼーション研究会は、研究所設立以来連綿と続いてきた。設立当初の志を引き継いで、継続することに意義がある。ただし継続システムそれ自体についての反省から、会の世話役が 3 年をめどに順次入れ替わってバトンをつなぐ制度を考えた。その枠組みの中で、研究所が主体的に取り組むテーマを広く共有することを会の目的とする。初回となる平成 25 年度には、「ワイルドライフサイエンス」を旗印にしたリーディング大学院を霊長研が主体となって始まった。そこで霊長類学の発展の方向として、自然学・保全生物学、動物園・水族館・博物館、海外の研究基地をもとにした一国アウトリーチ活動を視野に入れた、ワイルドライフに焦点を当てた研究会をめざした。霊長類学という枠を広げた話題提供をもとに、研究所のミッションを再考する契機にしたいと考えた。したがって、今回は 3 月 6-9 日に開催されたリーディング大学院のキックオフ・シンポジウムの中に組み入れて実施した。会場は国際高等研究所である。13 か国から 147 名の出席があった。詳細については以下のサイトを参照されたい。 <http://www.wildlife-science.org/kokoro/index.html#Symposium>

各日における話題提供者を列挙する。所属については京都大学のものは省略した。

3 月 6 日 (木)

山極寿一、Augustin Basabose (DRC)、Alfred Ngomanda (Gabon)、Sekou Keita (Guinea)、伊谷原一、杉浦秀樹、Fred Bercovitch、Cecile Garcia (France)、Zhang Peng (China).

3 月 7 日 (金)

友永雅己、渡辺茂 (慶大)、山岸俊男 (東大)、林美里、積山薫 (熊本大)、田中正之 (京都市動物園)、Sanha Kim (Korea)、坂本龍太、杉山茂 (静岡大)、堀江正彦 (Malaysia)、阿形清和、岸田拓士、平井啓久、今井啓雄、村山美穂、西田真也 (NTT)、坂上雅道 (玉川大)、足立幾磨、吉田正俊 (生理研)、渡邊正孝 (東京医科学研)。

3 月 8 日 (土)

岡本宗裕、菊水健史 (麻布大)、Michael Huffman、Andrew MacIntosh、古市剛史、湯本貴和、中川尚史、橋本千絵、岡安直比 (WWF)、揚妻直樹 (北大)、幸島司郎、David Hill、Anna Wong (Malaysia)、Sgarul Sah (Malaysia)、Charles Vairappan (Malaysia)、平田聡、服部裕子、山本真也 (神戸大)、松林公蔵。

3 月 9 日 (日)